



Europäisches
Patentamt
European Patent
Office
Office européen
des brevets

[Abstract of FR2877571](#)[Print](#)[Copy](#)[Contact Us](#)[Close](#)

Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; it is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

Present invention relates to of new usable activatable particles in the field of the health. It concerns particularly of the composite nanoparticles provided of an element of intracellular targeting capable to generate a response under excitation, and their uses in health, especially human. The particles of the invention include/understand a comprising core at least an inorganic compound and optionally one or more others made up (S) organic (S) and can be activated in vivo, to mark or deteriorate cells, fabrics or bodies. The invention also relates to production methods of such particles, as well as pharmaceutical compositions or diagnostic the container.

▲ top

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication : 2 877 571

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : 04 11806

⑤① Int Cl⁸ : A 61 K 9/51 (2006.01), A 61 K 9/16, 49/00, 49/18,
A 61 P 35/00

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 05.11.04.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 12.05.06 Bulletin 06/19.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : NANOBOTIX Société à responsabilité
limitée — FR.

⑦② Inventeur(s) : LEVY LAURENT, BOUSSAHA ABDEL
KADER et PANAK EDOUARD ANDRE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET BECKER ET ASSOCIES.

⑤④ NANOPARTICULES POURVUES D'UN ELEMENT DE CIBLAGE INTRACELLULAIRE, PREPARATION ET
UTILISATIONS.

⑤⑦ La présente invention concerne de nouvelles particules activables utilisables dans le domaine de la santé. Elle concerne plus particulièrement des nanoparticules composées pourvue d'un élément de ciblage intra-cellulaire capables de générer une réponse sous excitation, et leurs utilisations en santé, notamment humaine. Les particules de l'invention comprennent un noyau comprenant au moins un composé inorganique et éventuellement un ou plusieurs autres composé(s) organique(s) et peuvent être activées in vivo, pour marquer ou altérer des cellules, tissus ou organes. L'invention concerne également des méthodes de production de telles particules, ainsi que des compositions pharmaceutiques ou diagnostiques les contenant.

FR 2 877 571 - A1



NANOPARTICULES POURVUES D'UN ELEMENT DE CIBLAGE INTRA-CELLULAIRE, PREPARATION ET UTILISATIONS

La présente demande concerne de nouvelles particules activables utilisables dans le domaine de la santé. Elle concerne plus particulièrement des particules composites pourvues d'un élément de ciblage intra-cellulaire, capables de générer une réponse sous excitation, et leurs utilisations en santé, notamment humaine. Les particules de l'invention comprennent un noyau comprenant au moins un composé inorganique ou organique activable, pour marquer ou altérer des cellules, tissus ou organes. L'invention concerne également des méthodes de production de telles particules, ainsi que des compositions pharmaceutiques ou diagnostiques les contenant.

Durant les 30 dernières années, des avancées majeures ont été réalisées dans le domaine du diagnostic et du traitement des cancers humains. En parallèle, les biotechnologies et les nanotechnologies ont ouvert de nouvelles voies de développement et sont à l'origine de traitements nouveaux des pathologies humaines. En pratique, la chimiothérapie est la méthode la plus largement utilisée pour traiter de nombreux cancers. Elle présente toutefois certaines limites et des inconvénients conséquents. Le principal inconvénient de la chimiothérapie est certainement sa toxicité à l'égard des cellules saines du patient, qui restreint de façon drastique les doses de médicament susceptibles d'être employées pour détruire les cellules cancéreuses. De façon à fournir une approche chimiothérapeutique plus efficace, la recherche s'est concentrée sur le ciblage spécifique des molécules de chimiothérapie vers les cellules malades, les cellules cancéreuses étant reconnues en tant que cellules cibles via des molécules présentes à leur surface (Schally et al., 1999, J. Endocrinol., 141:1; Nagy et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:7269; Emons et al., 1993, J. Clin. Endocrinol. Metab., 77:1458).

Depuis 1950, les sondes et particules magnétiques ont été identifiées comme moyen de traitement potentiel des cancers. Les études démontrent que l'hyperthermie (Grittner et al., 1997, Hybridoma, 16:109; Higler et al., 1997,

Invest. Radiol., 32:705) générée par des particules magnétiques couplées à un champ magnétique de fréquence élevée pourrait être utilisée comme un adjuvant dans le traitement du cancer. Il a été démontré que l'activité hyperthermique (chaleur produite par l'énergie de relaxation magnétique du matériel magnétique) détruit effectivement les tissus cancéreux à proximité des sondes ou particules.

Le développement de très petites particules magnétiques (ferrofluides) présentant une cristallinité élevée a constitué l'étape ultérieure dans le développement de la thérapie basée sur l'hyperthermie induite par un champ magnétique. Ce traitement provoque une réduction de la taille de la tumeur quand les particules sont directement injectées dans le tissu. Cependant, aucune spécificité tissulaire ou cellulaire liée à cette thérapie n'a pu être démontrée.

Une approche basée sur l'utilisation de particules activables par application d'un champ magnétique a été décrite dans le brevet No. US6,514,481.

La thérapie photo dynamique (PDT) est une autre méthode de traitement récemment développée, utilisée pour traiter les cancers superficiels comme celui de la peau ou de l'œsophage (voir par exemple McCaughan, J.S. Jr., *Drugs and Aging*. 15: 49-68 (1999) "*Photodynamic Therapy: A Review*"). Ce traitement est basé sur la production de radicaux libres par des molécules photosensibles, lors de l'exposition à de forts rayonnements UV ou LASER. En effet, les molécules activées transforment l'oxygène qui les entoure en radicaux libres qui sont des espèces hautement réactives produisant des dommages irréversibles dans les cellules. Les organes cellulaires principalement attaqués sont les mitochondries, les membranes cellulaire et nucléaire, les lysosomes, etc. Les molécules photosensibles sont injectées par voie intraveineuse et sont généralement retenues en concentration supérieure dans les tissus cancéreux. Ceci permet, après un certain temps, d'avoir une concentration dans les tissus à traiter plus importante que dans les tissus sains. Lorsque ces molécules sont exposées à la lumière (avec une longueur d'onde appropriée), elles produisent

des radicaux libres à partir de l'oxygène, qui vont réagir avec des éléments vitaux de la cellule.

La thérapie photodynamique présente cependant certaines limites. En effet, les patients peuvent développer une certaine sensibilité à la lumière, ce qui limite le nombre d'applications de cette thérapie à un individu donné. D'autre part, les faibles longueurs d'ondes des rayonnements utilisés pour l'excitation des molécules photosensibles ne permettent pas de traverser une grande épaisseur de tissu, ce qui présente l'avantage d'être peu toxique pour les autres tissus, mais restreint l'indication aux cancers superficiels (peau et sous-cutanés). D'autres problèmes potentiels inhérents à l'utilisation de la thérapie photodynamique sont liés à la toxicité des molécules photosensibles et à la nécessité, dans certains cas, de l'utilisation d'oxygène pour « charger » les tissus à traiter.

Une autre approche utilisant des particules de TiO_2 a montré qu'il était possible de générer des radicaux libres à partir de molécules d'eau et d'oxygène sous une excitation UV (Shibata et al., *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 62:2306-2311 (1998)). Cette approche a été utilisée sur des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer de la vessie.

Une approche basée sur l'utilisation d'une nouvelle classe de particules, désignées NanoXRay, activables par des rayons X ou par des UV et capables, une fois activées, de générer des radicaux libres ou de la chaleur, a par ailleurs été décrite dans la demande FR 04 05036. Ces particules peuvent induire une réponse thérapeutique ou diagnostique *in vivo* même dans des tissus profonds.

La présente demande propose des améliorations aux nanoproduits à vocation thérapeutique ou diagnostique, tels ceux mentionnés ci-dessus.

Plus particulièrement, dans le cadre de la présente invention, les inventeurs ont cherché à minimiser la toxicité potentielle des nanoparticules capables de générer une réponse sous excitation, telles celles décrites dans l'art antérieur mentionné ci-dessus, en mettant au point de nouvelles nanoparticules activables, i.e., capables de marquer, altérer ou détruire des cellules, tissus ou organes, même à faibles concentrations, *in vivo*, *in vitro* ou *ex*

vivo. Ces objectifs ont été atteints par la mise au point de nouveaux composés utilisables en thérapeutique et/ou en diagnostique (par exemple en imagerie), notamment chez l'homme, reconnaissant de manière spécifique une molécule ou structure intra-cellulaire. Les particules de l'invention sont applicables à tout type de tissu, superficiel ou profond, chez tout organisme mammifère.

Un premier aspect de l'invention concerne ainsi des nanoparticules composites biocompatibles, comprenant :

- un noyau comprenant au moins un composé inorganique ou organique activable par excitation,
- de manière facultative, un enrobage biocompatible, et
- au moins une molécule de ciblage, de préférence exposée à la surface de la particule, présentant une affinité pour une molécule ou une structure intra-cellulaire.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de préparation de nanoparticules telles que définies ci-dessus comprenant :

- la formation d'un noyau comprenant un ou plusieurs composés tels que définis ci-dessus,
- l'enrobage éventuel du noyau,
- la fixation d'au moins une molécule de ciblage présentant une affinité pour une molécule ou une structure intra-cellulaire à la surface de ladite particule ainsi formée éventuellement enrobé(e) et, éventuellement
- la fixation d'au moins un élément de ciblage de surface permettant de cibler spécifiquement des cellules ou tissus biologiques.

Selon un autre aspect, l'invention réside dans des compositions, pharmaceutiques ou diagnostiques, comprenant des nanoparticules telles que définies ci-dessus ou susceptibles d'être obtenues par le procédé ci-dessus.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation des compositions et nanoparticules telles que définies ci-dessus, en combinaison avec une source

d'excitation appropriée (e.g., un rayonnement, une radiation, un champ externe, des ultrasons, etc.), pour le marquage, la destruction (ciblée), la détection ou la visualisation de cellules, tissus ou organes *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*, ainsi que dans des méthodes correspondantes.

Au sens de l'invention, on entend par « nanoparticule composite » tout produit complexe synthétique du type particule ou agrégat nanoparticulaire, de taille réduite, généralement inférieure à 1000 nm. Leur forme peut être variée, par exemple arrondie, aplatie, allongée, sphérique, ovale, etc. La forme est de préférence essentiellement sphérique. La forme peut être déterminée ou contrôlée par le procédé de fabrication, et adaptée par l'homme du métier selon les applications recherchées.

La forme des particules n'a pas une grande influence sur leurs propriétés, notamment sur le rendement de la production de radicaux libres ou de chaleur ou sur la nature des vibrations émises. Cependant, la forme peut influencer la « biocompatibilité » des particules. Ainsi, pour des raisons de pharmacocinétique, on préfère des nanoparticules de forme essentiellement sphérique ou arrondie. On préfère d'autre part des nanoparticules de forme assez homogène.

De manière préférée, la taille des nanoparticules selon l'invention est typiquement comprise entre 4 et 1000 nm environ. La taille des objets doit idéalement être suffisamment petite pour leur permettre de diffuser dans l'organisme (tissus, cellules, vaisseaux sanguins, etc.), essentiellement sans être captés par les macrophages (phagocytose) et sans provoquer d'obstruction significative.

Les nanoparticules selon l'invention doivent être biocompatibles, c'est-à-dire pouvoir être administrées à un organisme, typiquement un mammifère. Ce caractère biocompatible peut être assuré par exemple par la nature des composés constitutifs de la particule et/ou de l'enrobage éventuel.

Noyau

Comme indiqué précédemment, les particules selon l'invention comprennent un noyau contenant au moins un type de composé inorganique ou organique ayant des propriétés particulières, éventuellement recouvert d'un enrobage.

Un composé susceptible de rentrer dans la composition du noyau de la particule est un composé (ou un mélange de composés) inorganique(s) ou organique(s) capable(s) de générer une réponse sous excitation. Un composé adapté à la présente invention peut par exemple posséder des propriétés magnétiques, auquel cas la particule subit un changement d'orientation sous l'influence d'un champ magnétique. Un autre composé adapté peut absorber les rayons X, une lumière laser ou une lumière UV et émettre une réponse telle que de l'énergie UV-visible, de la chaleur ou des radicaux libres. Un autre type de composé adapté peut être sensible aux ultrasons et émettre de la chaleur ou une vibration particulière ou peut être sensible aux champs magnétiques alternatifs ou aux micro-ondes et générer de la chaleur, etc. La fonction principale de ce ou ces matériau(x) inorganique(s) ou organique(s) est de réagir à un stimulus et de générer un signal en réponse audit stimulus.

Composés sensibles à un champ magnétique

Les composés sensibles à un champ magnétique susceptibles de rentrer dans la composition du noyau d'une particule selon l'invention sont typiquement des composés inorganiques. De tels composés sont par exemple des métaux non oxydés, des oxydes métalliques ou des composés mixtes d'oxydes métalliques, permettant un retournement physique de la particule sous l'effet d'un champ magnétique. Il s'agit par exemple d'un oxyde ferreux ou ferrique, d'un oxyde de cobalt ou d'un oxyde de fer/cobalt mixte.

Composés sensibles aux rayons X

Les composés sensibles aux rayons X susceptibles de rentrer dans la composition du noyau d'une particule selon l'invention sont avantageusement des composés inorganique(s). Ces composés se présentent préférentiellement sous forme d'oxyde, hydroxyde, oxysulfure ou de sel, avantageusement dopé par un agent dopant, de préférence choisi parmi les terres rares (comme décrit dans le document FR 04 05036). Ils sont par exemple choisis parmi Y_2O_3 , $(Y,Gd)_2O_3$, $CaWO_4$, GdO_2S , $LaOBr$, $YTao_3$, $BaFCl$, Gd_2O_2S , $Gd_3Ga_5O_{12}$, $Rb_3Lu(PO_4)_2$ et $Cs_3Lu(PO_4)_2$. Le dopant utilisé est avantageusement une terre rare choisie par exemple parmi Gd, Eu, Tb, Er, Nb, Pr et Ce.

Des composés métalliques, en particulier non oxydés, peuvent par ailleurs être utilisés pour leur propriété d'absorption des Rayons X et émission de chaleur. Des composés métalliques présentant ces propriétés sont par exemple Au, Pb ou un mélange de matériaux amorphes et de composés métalliques.

Des molécules contenant des atomes sensibles aux rayons X peuvent également être utilisées.

Il est entendu que d'autres composés inorganiques, métaux, oxydes, hydroxydes, oxysulfures ou sels et dopants peuvent être envisagés par l'homme du métier pour rentrer dans la composition des noyaux des particules selon l'invention. Il est entendu que plusieurs métaux, oxydes, hydroxydes, oxysulfures ou sels et/ou dopants peuvent être utilisés en mélange dans le ou les noyaux d'une même particule de l'invention.

Composés sensibles aux rayons UV-visible IR

Les composés sensibles aux rayons UV-visible susceptibles de rentrer dans la composition du noyau des nanoparticules selon l'invention, sont avantageusement de nature inorganique et peuvent être choisis parmi les

composés semi-conducteurs, tels que notamment le TiO_2 , le ZnO et, de manière non restrictive, CdS , CdSe , CdTe , MnTe et des solutions mixtes (par exemple CdZnSe , CdMnSe , etc.), éventuellement dopé(e)s avec une terre rare (comme décrit dans le document FR 04 05036). Le ou les composés sensibles aux rayons UV-visible utilisés peuvent également être des composés/molécules organiques capables de produire de la chaleur ou des radicaux libres sous l'effet d'une lumière UV.

Composés sensibles à un rayonnement LASER

Un composé sensible à un rayonnement LASER, susceptible de rentrer dans la composition du noyau des nanoparticules selon l'invention, est de préférence un composé ou un mélange de composés/molécules photosensibles de nature organique ou inorganique. De tels composés sont par exemple constitués de molécules biologiques, chimiques ou d'un mélange de celles-ci. Le composé peut être un composé semi-conducteur ou une solution mixte, éventuellement dopé(e) avec une terre rare. Les molécules activées (sous l'effet d'une lumière LASER) transforment l'oxygène ou d'autres molécules qui les entourent en radicaux libres ou produisent de la chaleur.

Les molécules utilisées peuvent être par exemple et de façon non limitative l'haematoporphyrine, le mTHPC, la chlorine, la mono-L-aspartylchlorine, la phthalocyanine, etc. D'autres composés organiques utilisables dans le cadre de la présente invention peuvent être, par exemple, des semi-conducteurs (ZnO , TiO_2 , etc.), des métaux (Au , etc.).

Composés sensibles à d'autres types de rayonnement

Les composés sensibles à d'autres types de rayonnement, susceptibles de rentrer dans la composition du noyau des nanoparticules selon l'invention, sont de préférence choisis parmi un composé ou un mélange de composés de nature organique ou inorganique qui permet d'absorber un rayonnement de type Haute fréquence, Ultrasons, ondes radio, etc. ou d'interagir avec celui-ci.

De tels composés sont par exemple constitués de matériaux semi-conducteurs, magnétiques, isolants ou d'un mélange de ceux-ci.

Les composés activés peuvent par exemple et comme indiqué précédemment générer de la chaleur ou des vibrations.

De manière générale, l'efficacité ou les propriétés des particules peuvent être adaptées par l'homme du métier en jouant sur la quantité relative des différents types de composés, le recouvrement entre les spectres d'émission et d'absorption des composés, la structure cristalline des matériaux, la surface de contact entre un composé organique et l'eau et/ou la distance entre les composés.

Dans le noyau des particules de l'invention, le ou les composés inorganiques ou organiques peuvent être agencés ou organisés de différentes façons. Ainsi, un premier composé, de préférence inorganique, peut former le cœur du noyau, et un second composé (inorganique ou organique) se présenter sous forme d'une couche ou de nanoparticules à la surface du cœur. Plusieurs composés constitutifs du noyau peuvent également être disposés en multicouches successives, un premier composé inorganique formant préférentiellement la couche interne (le cœur). Le cœur du noyau formé par le premier composé inorganique présente typiquement une dimension comprise en 5 et 50 nm environ, par exemple entre 7 et 40 nm, et/ou la couche formée par le second composé à la surface du cœur possède une épaisseur comprise typiquement entre 1 et 30 nm environ, par exemple entre 2 et 25 nm.

Les composés du noyau peuvent également être présents sous forme d'un mélange de nanoparticules. De telles nanoparticules peuvent être de taille et de forme variées. Dans une autre variante de mise en œuvre, les composés inorganiques du noyau peuvent être présents sous forme d'au moins deux noyaux au contact l'un de l'autre.

L'homme du métier peut donc adapter les propriétés des particules en faisant varier les paramètres mentionnés ci-dessus, par exemple en fonction des utilisations envisagées (diagnostic, thérapeutique, etc.).

Il est entendu que les particules de l'invention peuvent comprendre, outre les différents types de composés décrits précédemment, d'autres molécules, composés ou matériaux de structure ou de surface, destinés à améliorer leur stabilité, propriété, fonction, spécificité, etc.

Enrobage

Comme indiqué précédemment, les nanoparticules selon l'invention peuvent comprendre en outre un enrobage. Un tel enrobage permet avantageusement de préserver l'intégrité des particules *in vivo*, d'assurer ou d'améliorer leur biocompatibilité, et de faciliter leur fonctionnalisation [par exemple avec des molécules de liaison (« spacer »), des polymères biocompatibles, des agents de ciblage, des protéines, etc.].

L'enrobage peut être composé de toute structure inorganique ou organique, amorphe ou cristalline. Pour préserver l'activité des particules de l'invention, selon la nature du noyau, il peut être souhaitable que l'enrobage permette la diffusion de petites molécules et/ou de radicaux libres. En particulier, il est important que l'enrobage permette le passage de l'eau (ou O₂) et de sa forme radicalaire après transformation lorsque la nanoparticule comprend un composé organique capable de réagir avec celle-ci. Ceci peut être assuré en utilisant des matériaux présentant une certaine porosité et/ou une couche d'enrobage de faible épaisseur et poreuse. Ainsi par exemple, on utilise typiquement un enrobage possédant une porosité comprise entre 0,2 et 10 nm. L'enrobage possède par ailleurs une épaisseur comprise généralement entre 0,1 et 50 nm environ, par exemple entre 0,2 et 40 nm.

De façon générale, l'enrobage peut être non-biodégradable ou biodégradable. Pour les enrobages non-biodégradables, on utilise par exemple un ou plusieurs matériaux choisis parmi la silice, l'agarose, l'alumine, un polymère carboné saturé ou un polymère inorganique, réticulé ou non, modifié

ou non (polystyrène, etc.). Pour les enrobages biodégradables, on utilise par exemple un ou plusieurs matériaux choisis parmi des molécules biologiques modifiées ou non, naturelles ou non, un polymère de molécule biologique modifiée ou non, de forme naturelle ou non, ou un polymère biologique, tel que le saccharide, un oligosaccharide, un polysaccharide, polysulfaté ou non, par exemple le dextran. Les matériaux ou composés ainsi mentionnés peuvent être utilisés seuls ou en mélanges ou en assemblages, composite ou non, covalent ou non, éventuellement en combinaison avec d'autres composés. D'autre part, on peut également utiliser tout matériau mentionné ci-dessus, hydro- ou liposoluble, de façon naturelle ou artificielle.

L'enrobage comprend de préférence un ou des composés choisis parmi la silice (SiO_2), l'alumine, les métaux (Au, etc.), le Polyéthylène Glycol (PEG) ou le Dextran, éventuellement en mélange(s).

L'enrobage peut par ailleurs comporter différents groupes fonctionnels (ou segments de liaison), permettant la liaison à la surface de la particule de toute molécule d'intérêt.

Des groupes fonctionnels utiles sont par exemple $(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, dans lequel n est un entier allant de 1 à 10. La molécule de ciblage et/ou l'élément de surface peuvent ainsi avantageusement être liés à l'enrobage via un groupe fonctionnel $(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ de l'enrobage dans lequel n est un entier allant de 1 à 10.

Les molécules couplées à la surface de la particule peuvent être, par exemple :

- un agent de ciblage de surface permettant de cibler spécifiquement des cellules ou tissus biologiques;
- une molécule assurant ou améliorant la biocompatibilité ; ou
- une molécule permettant à la particule d'échapper au système immunitaire (et notamment d'éviter les interactions avec les macrophages et SRE).

Dans un mode de réalisation particulier, les nanoparticules selon l'invention comprennent un enrobage auquel une molécule de ciblage intra-cellulaire et éventuellement un élément de ciblage de surface est lié, de préférence par l'intermédiaire d'un segment de liaison.

Elément de ciblage intra-cellulaire

Comme indiqué ci-dessus, la présente demande offre de nouveaux composés utilisables en thérapeutique et/ou en diagnostique, chez l'homme ou l'animal, reconnaissant de manière spécifique une structure ou molécule intra-cellulaire. La spécificité de reconnaissance des nanoparticules selon l'invention leur permet de marquer, altérer ou détruire des cellules, tissus ou organes, même à faibles concentrations, notamment in vivo. Les produits selon l'invention présentent donc un risque de toxicité potentielle réduit par rapport aux produits de l'art antérieur.

Un objet de l'invention concerne une nanoparticule telle que définie précédemment, caractérisée en ce qu'elle comprend une molécule de ciblage présentant une affinité pour une molécule présente dans une cellule humaine ou animale.

La molécule de ciblage présentant une affinité pour une molécule intra-cellulaire peut être une molécule biologique ou chimique. Une telle molécule est par exemple choisie parmi un peptide, un polypeptide, un acide nucléique, un nucléotide, un lipide, un métabolite, etc. La molécule de ciblage est de préférence un anticorps, un ligand de récepteur, un récepteur de ligand ou un fragment ou un dérivé de ceux-ci. Il peut s'agir également d'une hormone, d'un sucre, d'une enzyme, d'une vitamine ou autres. Des exemples particuliers de molécules de ciblage susceptibles d'être utilisées sont la phalloïdine, le phosphatidylinositol, la rhodamine ou l'HPPH, etc.

La molécule ou structure intra-cellulaire cible au sens de l'invention peut être une structure biologique ou chimique, par exemple une structure biologique choisie parmi une molécule d'une membrane intracellulaire telle que l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, des vésicules intra-cellulaires (endosome, peroxysome, etc.), ou d'une membrane nucléaire, etc., un lysosome, une molécule du cytosquelette, une molécule cytoplasmique, une mitochondrie, une enzyme (par exemple un enzyme de réplication, de réparation, de transcription ou de traduction de l'ADN, enzyme mitochondriale), un récepteur nucléaire, un acide nucléique [par exemple un préARN, un ARNm, un ARNt (notamment leur fragment anti-codon), un ARNr, un ADN], un facteur de transcription ou de traduction, un co-facteur (par exemple l'ATP, le CoA, le NAD, le NADPH, etc.), un substrat naturel (par exemple O₂ ou autres substrats ou produits de réaction), etc. La molécule ou structure intra-cellulaire cible au sens de l'invention, présentant une affinité pour la molécule de ciblage, peut également être de nature chimique. Il peut par exemple s'agir d'un substrat synthétique injecté artificiellement dans une cellule cible (O₂ ou autres substrats ou produits de réaction).

La molécule de ciblage est liée à l'enrobage éventuellement présent ou au noyau constitutif de ladite nanoparticule, i.e., au composé inorganique ou organique constitutif de ladite nanoparticule. La molécule est préférentiellement fixée de manière covalente à la surface ou adsorbée. Cette fixation peut se faire par exemple via des chaînes moléculaires hydrocarbonées de longueur variable mais aussi via d'autres types de molécules telles que des polysaccharides, polypeptides, de l'ADN, etc.

L'élément de ciblage intra-cellulaire permet de développer des nanoparticules capables de cibler une molécule ou une structure intra-cellulaire, de préférence un composant vital de la cellule lorsque ces nanoparticules sont utilisées en thérapie et au contraire, de préférence un composant non vital, lorsqu'elles sont utilisées en diagnostique. Des exemples de structures vitales préférentiellement ciblées sont le noyau, les mitochondries, des substrats (O₂

par exemple) ou des produits de réaction d'une voie métabolique nécessaire à la survie cellulaire, le but étant par exemple de geler des équilibres réactionnaires et donc l'ensemble du fonctionnement cellulaire. Comme le démontrent les exemples et comme rappelé précédemment, des doses de nanoparticules moins importantes peuvent être employées pour atteindre le résultat attendu en thérapie, i.e., la destruction de la cellule, lorsque la nanoparticule comprend à la fois un élément de ciblage de surface et une molécule de ciblage d'une molécule ou structure intra-cellulaire au lieu du seul élément de ciblage de surface (cf. Figures 3 et 4 qui concernent respectivement des nanoparticules activées par un rayonnement LASER et par un champ magnétique).

La rhodamine est utilisée comme molécule de ciblage dans les exemples de la demande. Cette molécule présente une affinité pour les mitochondries naturellement présentes à l'intérieur des cellules. Le ciblage, permis par la rhodamine, des nanoparticules selon l'invention vers les mitochondries intra-cellulaires, favorise la destruction de la cellule lors de l'exposition à une source d'excitation, dans la mesure où les mitochondries constituent un élément vital de cette cellule.

Élément de ciblage de surface

Les nanoparticules selon l'invention peuvent comprendre, outre la molécule de ciblage présentant une affinité pour une structure ou une molécule intra-cellulaire, un élément de surface permettant de cibler spécifiquement des cellules ou des tissus biologiques. Cet élément de surface peut être lié aux particules par tout moyen, de préférence covalent, éventuellement par l'intermédiaire d'un segment de liaison. Il peut être associé au noyau, e.g., à un composé inorganique, ou à l'enrobage éventuellement présents, comme il sera décrit dans la suite du texte.

L'élément de ciblage de surface peut être toute structure biologique ou chimique présentant une affinité pour des molécules présentes dans le corps humain ou animal. Il peut ainsi s'agir d'un peptide, d'un polypeptide, d'une protéine, d'une glycoprotéine, d'un lipide, etc. Il peut par exemple s'agir d'une hormone, d'une vitamine, d'un enzyme, etc. et, de manière générale, de tout ligand de molécules (par exemple récepteurs, marqueurs, antigènes, etc.). On peut mentionner à titre d'illustration des ligands de molécules exprimées par des cellules pathologiques, notamment des ligands d'antigènes tumoraux, de récepteurs hormonaux, de récepteurs de cytokines ou de récepteurs de facteurs de croissance, par exemple. De tels éléments de ciblage peuvent être par exemple choisis parmi la LHRH, l'EGF, un folate, l'anticorps anti-B-FN, la E-selectin / P-selectin, l'anticorps Anti-IL-2Ra, la GHRH, le trastuzumab, le Gefitinib, la PSMA, le Tamoxifen / toremifen, l'Imatinib, le Gemtuzumab, le Rituximab, l'Alemtuzumab, le Cetximab, une LDL.

L'élément de ciblage de surface permet, lorsqu'il est présent, une reconnaissance et une accumulation préférentielle des particules de l'invention dans des cellules, tissus ou organes d'intérêt, et ainsi de confiner l'action à ces tissus. Un tel ciblage est particulièrement utile lorsque les particules sont administrées par voie systémique, par exemple pour les tissus profonds.

L'élément de ciblage de surface permettant de cibler spécifiquement des cellules ou des tissus biologiques est lié à l'enrobage éventuellement présent ou au composé inorganique ou organique constitutif de ladite nanoparticule.

La présence combinée, au niveau des nanoparticules selon l'invention, d'une molécule de ciblage présentant une affinité pour une molécule ou pour une structure intra-cellulaire et d'un élément de ciblage de surface permettant de cibler spécifiquement des cellules ou des tissus biologiques, améliore la spécificité de reconnaissance desdites nanoparticules pour leur cible. Cette spécificité accrue des nanoparticules leur permet de marquer, altérer ou détruire des cellules, tissus ou organes, même à faibles concentrations, notamment in

vivo, réduisant ainsi, comme indiqué précédemment, les risques de toxicité potentielle inhérents à l'usage de toute composition pharmaceutique ou diagnostique.

La LHRH est utilisée comme élément de ciblage de surface dans les exemples de la demande. Cette molécule présente une affinité pour les récepteurs de la LHRH présents à la surface des cellules cancéreuses, notamment dans le cadre des cancers hormono-dépendants. La LHRH permet, par exemple, de cibler des cellules de tumeurs du sein, de l'ovaire ou de la prostate. Le double ciblage, permis par la LHRH et par la rhodamine, des nanoparticules selon l'invention vers les mitochondries de cellules cancéreuses, favorise la destruction de ces cellules lors de l'exposition à une source d'excitation. Comme le démontre l'exemple 4 en particulier, l'efficacité des nanoparticules selon l'invention, en terme de destruction des cellules cibles, est accrue lorsque le double ciblage, i.e., la fixation d'une molécule de ciblage présentant une affinité pour une molécule ou une structure intra-cellulaire et celle d'un élément de ciblage de surface, est mis en pratique.

Procédé de production

Les nanoparticules de l'invention peuvent être produites par toute technique connue dans le domaine.

Un objet de l'invention concerne un procédé de production de nanoparticules tels que définies précédemment, comprenant :

- la formation d'un noyau comprenant un ou plusieurs composés tels que définis précédemment,
- l'enrobage éventuel du noyau,
- la fixation d'au moins une molécule de ciblage présentant une affinité pour une molécule ou une structure intra-cellulaire à la surface de ladite particule ainsi formée éventuellement enrobé(e) et, éventuellement

- la fixation d'au moins un élément de ciblage de surface permettant de cibler spécifiquement des cellules ou tissus biologiques.

Les matériaux qui composent les nanoparticules de l'invention peuvent être produits par différentes techniques, qui sont connues en soi de l'homme du métier. Le procédé peut être adapté par l'homme du métier selon la nature des composés utilisés, et selon leur agencement dans les nanoparticules. Des méthodes alternatives de production de matériaux utilisables pour la production des particules de l'invention sont décrites par exemple dans Nelson et al, Chem. Mater. 2003, 15, 688-693 "Nanocrystalline Y₂O₃:Eu Phosphors Prepared by Alkalide Reduction" ou encore dans Liu et al., Journal of Magnetism and Magnetic Materials 270 (2004) 1-6 "Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres" ainsi que dans les documents brevet FR 04 05036 et US 6,514,481.

Les méthodes d'accrochage des éléments de ciblage peuvent être effectuées en suivant par exemple le protocole décrit dans L. Levy et al., « *Nanochemistry: Synthesis and Characterization of Multifunctional NanoBiodrugs for Biological Applications.* » (Chem. Mater.; 2002; 14(9), 3715 – 3721).

Comme indiqué précédemment, la forme des particules n'a pas une grande influence sur leur propriétés, notamment sur le rendement de la production de radicaux libres ou de chaleur ou sur la nature des vibrations émises. Cependant, la forme pouvant influencer la « biocompatibilité » des particules, les formes essentiellement sphériques ou arrondies ainsi que les formes essentiellement homogènes, sont préférées.

De manière préférée, et comme indiqué au préalable, la taille des nanoparticules selon l'invention est typiquement comprise entre 4 et 1000 nm environ, de préférence entre 300 et 1000 nm, encore plus préférentiellement entre 4 et 250 nm. Pour des applications *in vivo* chez l'homme ou l'animal, on

préfère tout particulièrement des nanoparticules dont la taille est comprise entre 4 et 100 nm, encore plus préférentiellement entre 4 et 50 nm. La taille des objets doit idéalement être suffisamment petite pour leur permettre de diffuser dans l'organisme (tissus, cellules, vaisseaux sanguins, etc.), essentiellement sans être captés par les macrophages (phagocytose) et sans provoquer d'obstruction significative. De tels effets peuvent être obtenus avantageusement chez l'homme avec des particules d'une taille inférieure à 100 nm, préférentiellement inférieure à 50 nm.

La forme et la taille des nanoparticules peuvent aisément être calibrées par l'homme du métier mettant en œuvre les procédés de préparation des nanoparticules selon l'invention.

Compositions

Un autre objet de l'invention réside dans toute composition comprenant des nanoparticules telles que définies précédemment et/ou susceptibles d'être obtenues par le procédé décrit ci-dessus. Bien que cela ne soit pas obligatoire, dans les compositions de l'invention, les particules présentent avantageusement une forme et une taille assez homogènes. Généralement, les compositions comprennent entre 0,3 et 3000 mg de particules pour 100ml. Les compositions peuvent être sous forme solide, liquide (particules en suspension), de gel, pâte, etc.

Un objet particulier de l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant des nanoparticules telles que définies précédemment et, éventuellement, un excipient ou véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique.

Un autre objet particulier de l'invention concerne une composition diagnostique ou d'imagerie comprenant des nanoparticules telles que définies

précédemment et, éventuellement, un excipient ou véhicule acceptable sur le plan physiologique.

L'excipient ou véhicule mis en œuvre peut être tout support habituel pour ce type d'applications, comme par exemple des solutions salines, isotoniques, stériles, tamponnées, etc. Les compositions de l'invention peuvent comprendre en outre des agents de stabilisation, des agents édulcorants, tensio-actifs, etc. Elles peuvent être formulées sous forme d'ampoules, de flacons, de comprimés, de gélules, en utilisant des techniques de galénique connues en soi.

Utilisations

Les compositions, particules et agrégats de l'invention peuvent être utilisés dans de nombreux domaines, particulièrement en médecine humaine ou animale.

Selon le temps d'exposition à la source d'excitation, les particules peuvent permettre la destruction de cellules ou de tissus ou, simplement, une visualisation (imagerie, diagnostic).

L'homme du métier est aisément en mesure d'adapter la durée d'exposition des nanoparticules selon l'invention à la source d'excitation en fonction de la nature et de l'intensité de ladite source, selon que la destruction des cellules ou leur visualisation est souhaitée. Dans le cadre d'une utilisation thérapeutique, les nanoparticules selon l'invention peuvent être exposées à une source d'excitation pendant une durée, habituellement comprise, par exemple, entre une seconde et deux heures, de préférence entre 30 minutes et une heure, encore plus préférentiellement pendant une durée inférieure ou égale à environ 30 minutes, par exemple 5, 10 ou 15 minutes. Dans le cadre d'une utilisation diagnostique, les temps d'exposition des nanoparticules selon l'invention varient généralement entre une seconde et environ 30 minutes, par exemple entre une minute et environ 20 minutes ou entre une seconde et environ 5 minutes, voire entre une et 60 secondes environ. Il est entendu que plus la surface exposée à la source

d'excitation est importante, plus la durée d'exposition sera importante et que la durée d'exposition est par ailleurs inversement proportionnelle à l'intensité de la source d'excitation.

Un objet particulier de l'invention réside dans l'utilisation de compositions, ou nanoparticules telles que définies précédemment, en combinaison avec une source d'excitation adaptée au noyau de la nanoparticule, pour la préparation d'un médicament destiné à la destruction de cellules cibles.

Un autre objet particulier de l'invention réside dans une méthode pour induire ou causer la lyse ou la destruction de cellules cibles, *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*, comprenant la mise en contact de cellules cibles avec une ou des nanoparticules telles que définies précédemment, pendant une période de temps suffisante pour permettre aux nanoparticules de pénétrer dans des cellules cibles et, l'exposition des cellules à une source d'excitation adaptée au noyau des nanoparticules, ladite exposition induisant ou causant la lyse ou la destruction desdites cellules cibles.

Les cellules cibles peuvent être toutes cellules pathologiques, c'est-à-dire des cellules impliquées dans un mécanisme pathologique, par exemple des cellules prolifératives, telles que des cellules tumorales, sténosantes (cellules du muscle lisse), ou du système immunitaire (clones de cellules pathologiques).

Une application préférée réside dans le traitement (par exemple la destruction ou l'altération des fonctions) de cellules cancéreuses. A cet égard, un objet particulier de l'invention réside dans l'utilisation de compositions ou nanoparticules telles que définies précédemment (en combinaison avec une source d'excitation adaptée au noyau des nanoparticules) pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du cancer.

Un autre objet de l'invention concerne une méthode de traitement du cancer, comprenant l'administration à un patient atteint d'un cancer d'une

composition ou de nanoparticules telles que définies précédemment, dans des conditions permettant aux nanoparticules de pénétrer dans les cellules cancéreuses, et le traitement ultérieur du patient en présence d'une source d'excitation adaptée au noyau des nanoparticules qui peut être choisie parmi un rayonnement, une radiation ou un champ externe, plus particulièrement parmi les rayons X et les rayons UV, un champ magnétique extérieur, des ultrasons, etc., conduisant à une altération, une perturbation ou une destruction fonctionnelle de cellules cancéreuses du patient, traitant ainsi le cancer.

L'invention est utilisable pour traiter tout type de cancer, notamment les tumeurs solides, métastasées ou non, par exemple choisies parmi les cancers du poumon, foie, rein, vessie, sein, tête-et-cou, cerveau, ovaires, prostate, peau, intestin, colon, pancréas, œil, etc.

L'invention est également utilisable pour traiter une pathologie cardio-vasculaire telle que l'athérosclérose par exemple ou pour traiter une pathologie neurodégénérative par exemple choisie parmi la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la chorée de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique, la sclérose en plaques. Le type de nanoparticules (et son effet thérapeutique associé) ainsi que la molécule de ciblage intra-cellulaire et la molécule de ciblage de surface, éventuellement présente, permettant de cibler spécifiquement des cellules ou tissus biologiques, peuvent ainsi être choisies en fonction du type de cellule ou tissu malade.

Les stimuli peuvent être appliqués à tout moment après l'administration des particules, en une ou plusieurs fois, en utilisant tout système adapté déjà disponible tels que par exemple, un système de radiothérapie ou de radiographie (scanner par exemple). Les particules peuvent être administrées par différentes voies, de préférence par injection, systémique ou locale, ou de manière orale. Des injections ou administrations répétées peuvent être envisagées, si nécessaire.

Des exemples de rayonnements et d'intensité de rayonnements susceptibles d'être mis en œuvre pour exciter les particules comprenant un composé sensible aux rayons X en fonction de l'utilisation diagnostique ou thérapeutique souhaitée sont indiquées dans le document FR 04 05036 et rappelés ci-dessous :

De façon générale et non restrictive, les rayonnements suivants peuvent être appliqués dans différents cas pour exciter les particules :

- Rayons X superficiels (20 à 50 keV) : pour l'excitation de nanoparticules en superficie (pénétration de quelques millimètres).
- Rayons X pour le diagnostic 50 à 150 keV.
- Rayons X (ortho voltage) de 200 à 500 keV permettant de pénétrer des épaisseurs de tissus jusqu'à 6 cm.
- Rayons X (méga voltage) de 1000keV 25000keV. Pour exemple l'excitation de nanoparticules pour le traitement du cancer de la prostate peut se faire via 5 rayons X focalisés ayant une énergie de 15000keV.

La durée d'exposition à des rayons X tels que décrits ci-dessus pourra être aisément déterminée par l'homme du métier en fonction de l'utilisation thérapeutique ou diagnostique souhaitée et de la nature des nanoparticules.

Des champs magnétiques de 1.5, 4 ou 5 Teslas par exemple, de même que des champs supérieurs à 5 Teslas, peuvent par ailleurs être appliqués aux nanoparticules selon l'invention comprenant un composé sensible à un champ magnétique. L'homme du métier sera en mesure de déterminer lui-même le champ magnétique à appliquer et sa durée en fonction de l'utilisation thérapeutique ou diagnostique souhaitée. De même, l'homme du métier pourra aisément déterminer la durée et l'intensité d'une exposition à un rayonnement laser, UV ou à des ultrasons selon les applications envisagées et la nature des nanoparticules utilisées.

Dans le domaine diagnostique, les particules de l'invention sont utilisables comme agent de contraste, pour détecter et/ou visualiser tout type de tissu.

Elles peuvent également être utilisées pour geler des équilibres réactionnaires et donc le fonctionnement cellulaire.

Ainsi, un objet de l'invention concerne l'utilisation de compositions, ou nanoparticules telles que définies précédemment, en combinaison avec un stimulus (source d'excitation des particules) adapté, pour la fabrication d'une composition destinée à la détection ou à la visualisation de cellules, tissus ou organes.

Les sources d'excitation adaptées sont celles mentionnées précédemment. Des cellules cibles susceptibles d'être détectées ou visualisées sont par exemple les cellules cancéreuses.

Le terme "en combinaison" indique que l'effet recherché est obtenu lorsque les cellules, tissus ou organes d'intérêt, ayant incorporé en partie des nanoparticules de l'invention, sont excités par la source déterminée. Toutefois, il n'est pas nécessaire que les particules et les stimuli soient administrés simultanément, ni selon le même protocole.

Le terme "traitement" désigne toute amélioration des signes pathologiques, comme notamment une diminution de la taille ou du développement d'une tumeur ou d'une zone tissulaire pathologique, la suppression ou la destruction de cellules ou tissus pathologiques, un ralentissement de la progression de la pathologie, une réduction de la formation de métastases, une régression ou une rémission complète, etc.

Les particules de l'invention peuvent également être utilisées *in vitro* ou *ex vivo*.

D'autres aspects et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LEGENDE DES FIGURES

La **Figure 1** fournit une représentation schématique du principe de double ciblage (Module A : ciblage extra-cellulaire permettant la reconnaissance spécifique d'un type cellulaire, d'un organe, d'un tissu biologique du corps à traiter ; et Module B : ciblage intra-cellulaire permettant la reconnaissance spécifique d'une molécule ou d'une structure intra-cellulaire) avec des nanoparticules activables par un champ externe.

La **Figure 2** présente les différents mécanismes d'action des nanoparticules en thérapie ou en diagnostic.

La **Figure 3** indique le taux de survie des cellules MCF7 (lignée cellulaire d'origine humaine, cancer du sein) après incubation avec des nanoparticules photosensibles de l'invention et exposition ou non à un rayonnement Laser. Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- a) Nanoparticules, mises en présence de rhodamine libre et de LHRH libre, les nanoparticules, la rhodamine et la LHRH étant dispersées dans une solution isotonique. Cellules non exposées à un rayonnement Laser. Expérience effectuée pendant 10 minutes, sur 4 boîtes de pétri en parallèles.
- b) Nanoparticules, pourvues d'une molécule de ciblage présentant une affinité pour une molécule ou une structure intra-cellulaire, i.e., la rhodamine (molécule de ciblage présentant une affinité pour les mitochondries), mises en présence de LHRH libre, les nanoparticules et la LHRH étant dispersées dans une solution isotonique. Cellules exposées à un rayonnement Laser (10 minutes). Expérience effectuée sur 4 boîtes de pétri en parallèle.
- c) Nanoparticules pourvues d'une molécule de ciblage présentant une affinité pour une molécule ou une structure intra-cellulaire, i.e., la rhodamine, et d'un élément de ciblage de surface permettant de cibler

spécifiquement des cellules ou des tissus biologiques, i.e., LHRH (élément de ciblage de surface présentant une affinité pour les cellules cancéreuses), les nanoparticules étant dispersées dans une solution isotonique. Cellules exposées à un rayonnement Laser (10 minutes). Expérience effectuée sur 4 boîtes de pétri en parallèles.

La **Figure 4** indique le taux de survie des cellules MCF7 après incubation avec des nanoparticules magnétiques de l'invention et exposition ou non à un champ magnétique. Les conditions expérimentales sont :

- a) Nanoparticules, mises en présence de rhodamine libre et de LHRH libre, les nanoparticules, la rhodamine et la LHRH étant dispersées dans une solution isotonique. Cellules non exposées au champ magnétique. Expérience effectuée pendant 10 minutes sur 4 boîtes de pétri en parallèle.
- b) Nanoparticules pourvues d'une molécule de ciblage présentant une affinité pour une molécule ou une structure intra-cellulaire, i.e., la rhodamine (molécule de ciblage présentant une affinité pour les mitochondries), mises en présence de LHRH libre, les nanoparticules et la LHRH étant dispersées dans une solution isotonique. Cellules exposées au champ magnétique (10 minutes). Expérience effectuée sur 4 boîtes de pétri en parallèle.
- c) Nanoparticules pourvues d'une molécule de ciblage présentant une affinité pour une molécule ou une structure intra-cellulaire, i.e., la rhodamine, et d'un élément de ciblage de surface permettant de cibler spécifiquement des cellules ou des tissus biologiques, i.e., LHRH (élément de ciblage de surface présentant une affinité pour les cellules cancéreuses), les nanoparticules étant dispersées dans une solution isotonique. Cellules exposées au champ magnétique (10 minutes). Expérience effectuée sur 4 boîtes de pétri en parallèle.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : Préparation de nanoparticules photosensibles dopées avec la protoporphyrine IX et ciblées

Des nanoparticules photosensibles dopées avec la protoporphyrine IX et ciblées, ont été synthétisées en utilisant le procédé suivant :

- a) 0.5 g d'AOT mélangés à 0.5 g de Butanol sont dissous dans 20ml d'eau distillée,
- b) 30 microlitre de DMF et 15nM de protoporphyrine IX sont ajoutés à la solution obtenue en a) et mélangés,
- c) du triethoxyvinylsilane (200 micro L) et du 3-aminopropyltriethoxysilane (10 microlitres) sont ajoutés au mélange obtenu en b) et mélangés pendant plusieurs heures,
- d) la solution obtenue en c) est dialysée et filtrée
- e) des molécules d'acide 3-(triéthoxysilanylpropyl-carbamoyl)-butyrique sont ajoutées aux nanoparticules de la solution d), dispersées dans le DMF, le mélange est ensuite agité pendant 24h,
- f) L'élément de ciblage présentant une affinité pour une molécule ou une structure intra-cellulaire (rhodamine) et l'élément de ciblage de surface (LHRH) sont ajoutés au mélange obtenu en e) en utilisant la procédure décrite dans L. Levy et al., « *Nanochemistry: Synthesis and Characterization of Multifunctional NanoBiodrugs for Biological Applications.* » (Chem. Mater.; 2002; 14(9), 3715 – 3721), puis
- g) les nanoparticules sont récupérées et leur intégrité est contrôlée.

EXEMPLE 2 : Préparation de trois échantillons pour l'expérimentation *in vitro* :

L'échantillon a) est constitué de nanoparticules, mises en présence de rhodamine et de LHRH libres, les nanoparticules, la rhodamine et la LHRH étant dispersées dans une solution isotonique.

L'échantillon b) est constitué de nanoparticules, pourvues d'une molécule de ciblage présentant une affinité pour une molécule ou une structure intra-

cellulaire (rhodamine), mise en présence de LHRH, les nanoparticules et la LHRH étant dispersées dans une solution isotonique.

L'échantillon c) est constitué de nanoparticules pourvues d'une molécule de ciblage présentant une affinité pour une molécule ou une structure intracellulaire (rhodamine) et d'un élément de ciblage de surface permettant de cibler spécifiquement des cellules ou des tissus biologiques (LHRH), lesdites nanoparticules étant dispersées dans une solution isotonique.

Les trois échantillons (a, b et c) sont ajoutés à des cellules MCF7 (lignée cellulaire d'origine humaine, cancer du sein) puis incubés 20h. La concentration utilisée est de 2 μ moles de particules par boîte de pétri. Après incubation, les cellules contenant les échantillons a et b sont exposées 10 minutes à une source laser (650nm). Le taux de survie des cellules est mesuré 20 minutes après exposition.

L'expérience est répétée quatre fois afin d'avoir un résultat statistiquement significatif. Les résultats présentés sur la figure 3 montrent une efficacité (destruction cellulaire) plus importante des nanoparticules de l'échantillon c (avec le double ciblage).

EXEMPLE 3 : Préparation de nanoparticules magnétiques

Des nanoparticules magnétiques ont été synthétisées en utilisant le procédé suivant :

- a) 32g de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ et 8g de $\text{Fe}(\text{Cl})_2$ sont coprécipités avec de la soude (13g) à une température de 70°C sous agitation (réacteur de 1 litre) ;
- b) les nanoparticules obtenues en a), après rinçage à l'eau (PH =8), sont dispersées dans un mélange éthanol/eau (4/1). Le TEOS est ajouté (proportion masse TEOS = 1,2 masse particules) et agité pendant plusieurs heures ;
- c) des molécules d'acide 3-(triéthoxysilanylpropyl-carbamoyl)-butyrique sont ajoutées aux nanoparticules dispersées dans le DMF et agitées pendant 24h ;
- d) l'élément de ciblage présentant une affinité pour une molécule ou une structure intracellulaire (rhodamine) et l'élément de ciblage de surface (LHRH)

sont ajoutés en utilisant la procédure décrite dans L. Levy et al., « *Nanochemistry: Synthesis and Characterization of Multifunctional NanoBiodrugs for Biological Applications.* » (Chem. Mater.; 2002; 14(9), 3715 – 3721).

EXEMPLE 4 : Préparation de trois échantillons pour l'expérimentation *in vitro* :

L'échantillon a) est constitué de nanoparticules, mises en présence de rhodamine et de LHRH libres, les nanoparticules, la rhodamine et la LHRH étant dispersées dans une solution isotonique.

L'échantillon b) est constitué de nanoparticules, pourvues d'une molécule de ciblage présentant une affinité pour une molécule ou une structure intracellulaire (rhodamine), mise en présence de LHRH, les nanoparticules et la LHRH étant dispersées dans une solution isotonique.

L'échantillon c) est constitué de nanoparticules pourvues d'une molécule de ciblage présentant une affinité pour une molécule ou une structure intracellulaire (rhodamine) et d'un élément de ciblage de surface permettant de cibler spécifiquement des cellules ou des tissus biologiques (LHRH), lesdites nanoparticules étant dispersées dans une solution isotonique.

Les trois échantillons (a, b et c) sont ajoutés puis incubés 20h avec des cellules MCF7. La concentration utilisée de particules est de 0,5 picogrammes par boîte de pétri. Après incubation, les cellules contenant les échantillons b) et c) sont exposées 10 minutes à un champ magnétique unidirectionnel (4.7Tesla). Le taux de survie des cellules est mesuré 20 minutes après exposition.

L'expérience est répétée quatre fois afin d'avoir un résultat statistiquement significatif. Les résultats présentés sur la figure 4 montrent une efficacité (destruction cellulaire) plus importante des nanoparticules de l'échantillon c) (avec le double ciblage).

REVENDECATIONS

1. Nanoparticule composite biocompatible, comprenant :

- un noyau comprenant au moins un composé inorganique ou organique activable par excitation,
- de manière facultative, un enrobage biocompatible, et
- au moins une molécule de ciblage, exposée à la surface de la particule, présentant une affinité pour une molécule ou une structure intra-cellulaire.

2. Nanoparticule selon la revendication 1, caractérisée en ce que le noyau comprend un oxyde métallique ou un métal non oxydé, permettant un retournement physique de la particule sous l'effet d'un champ magnétique.

3. Nanoparticule selon la revendication 1, caractérisée en ce que le noyau comprend une molécule photosensible, permettant la production de chaleur ou de radicaux libres sous l'effet d'une lumière LASER.

4. Nanoparticule selon la revendication 1, caractérisée en ce que le noyau comprend un composé semi-conducteur ou une solution mixte, éventuellement dopé(e) avec une terre rare, ou une molécule organique, permettant la production de chaleur ou de radicaux libres sous l'effet d'une lumière UV ou Laser.

5. Nanoparticule selon la revendication 1, caractérisée en ce que le noyau comprend un composé inorganique sous forme d'oxyde, hydroxyde, oxysulfure, de sel ou de mélanges de ces derniers éventuellement dopés avec une terre rare, ou de métal non oxydé, permettant la production de chaleur ou de radicaux libres sous l'effet de rayons X.

6. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'enrobage éventuellement présent est composé d'une structure inorganique ou organique, amorphe ou cristalline.

7. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la molécule de ciblage est une molécule biologique ou chimique présentant une affinité pour une molécule présente dans une cellule humaine ou animale telle qu'un peptide, un polypeptide, un acide nucléique, un nucléotide, un lipide ou un métabolite.

8. Nanoparticule selon la revendication 7, caractérisée en ce que la molécule de ciblage présente une affinité pour une molécule d'une membrane intracellulaire ou nucléaire, une molécule du cytosquelette, une molécule cytoplasmique ou une mitochondrie.

9. Nanoparticule selon la revendication 7 ou 8, caractérisée en ce que la molécule de ciblage présente une affinité pour une enzyme, un récepteur nucléaire, un facteur de transcription ou de traduction, un co-facteur ou un substrat naturel ou synthétique injecté artificiellement dans une cellule cible.

10. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications 7-9, caractérisée en ce que la molécule de ciblage est un anticorps, un ligand de récepteur, un récepteur de ligand ou un fragment ou un dérivé de ceux-ci.

11. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la molécule de ciblage est liée à l'enrobage éventuellement présent ou au noyau constitutif de ladite particule.

12. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un élément de surface permettant de cibler spécifiquement des cellules ou des tissus biologiques.

13. Nanoparticule selon la revendication 12, caractérisée en ce que l'élément de surface permettant de cibler spécifiquement des cellules ou des tissus

biologiques est lié à l'enrobage éventuellement présent ou au noyau de ladite particule.

14. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisée en ce que la molécule de ciblage et/ou l'élément de surface sont liés à l'enrobage via un groupe fonctionnel $(CH_2)_nCOOH$ dans lequel n est un entier allant de 1 à 10.

15. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que sa taille est comprise entre 4 et 1000 nm, de préférence entre 300 et 1000 nm, encore plus préférentiellement entre 4 et 250 nm, entre 4 et 100 nm ou entre 4 et 50 nm.

16. Nanoparticule selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que sa forme est essentiellement sphérique.

17. Procédé de production de nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, comprenant :

- la formation d'un noyau comprenant un ou plusieurs composés tels que définis dans les revendications 1 à 15,
- l'enrobage éventuel du noyau,
- la fixation d'au moins une molécule de ciblage présentant une affinité pour une molécule ou une structure intra-cellulaire à la surface de ladite particule ainsi formée éventuellement enrobé(e) et, éventuellement
- la fixation d'au moins un élément de ciblage de surface permettant de cibler spécifiquement des cellules ou tissus biologiques.

18. Composition pharmaceutique ou diagnostique comprenant des nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 1 à 16.

19. Utilisation de nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, ou d'une composition selon la revendication 18, en combinaison avec une

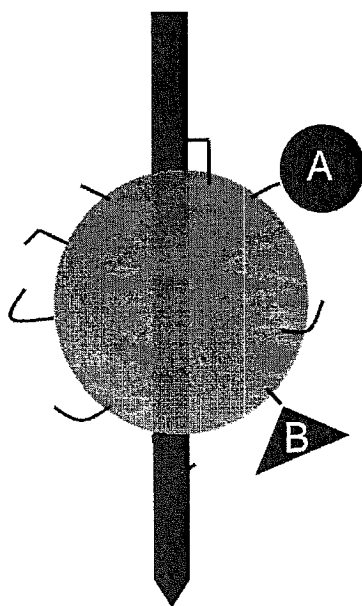
source d'excitation adaptée au noyau des nanoparticules, pour la préparation d'un médicament destiné à la destruction de cellules cibles.

20. Utilisation de nanoparticules selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, ou d'une composition selon la revendication 18, en combinaison avec une source d'excitation adaptée au noyau des nanoparticules, pour la préparation d'une composition destinée à la détection ou à la visualisation de cellules, tissus ou organes.

21. Utilisation selon la revendication 19 ou 20, caractérisée en ce que les cellules cibles sont des cellules cancéreuses.

22. Utilisation selon la revendication 19 ou 20, caractérisée en ce que la source d'excitation est un rayonnement, une radiation ou un champ externe.

1/4



Excitation par un champ externe
générant un effet physique, physico-
chimique ou chimique.

Figure 1

2/4

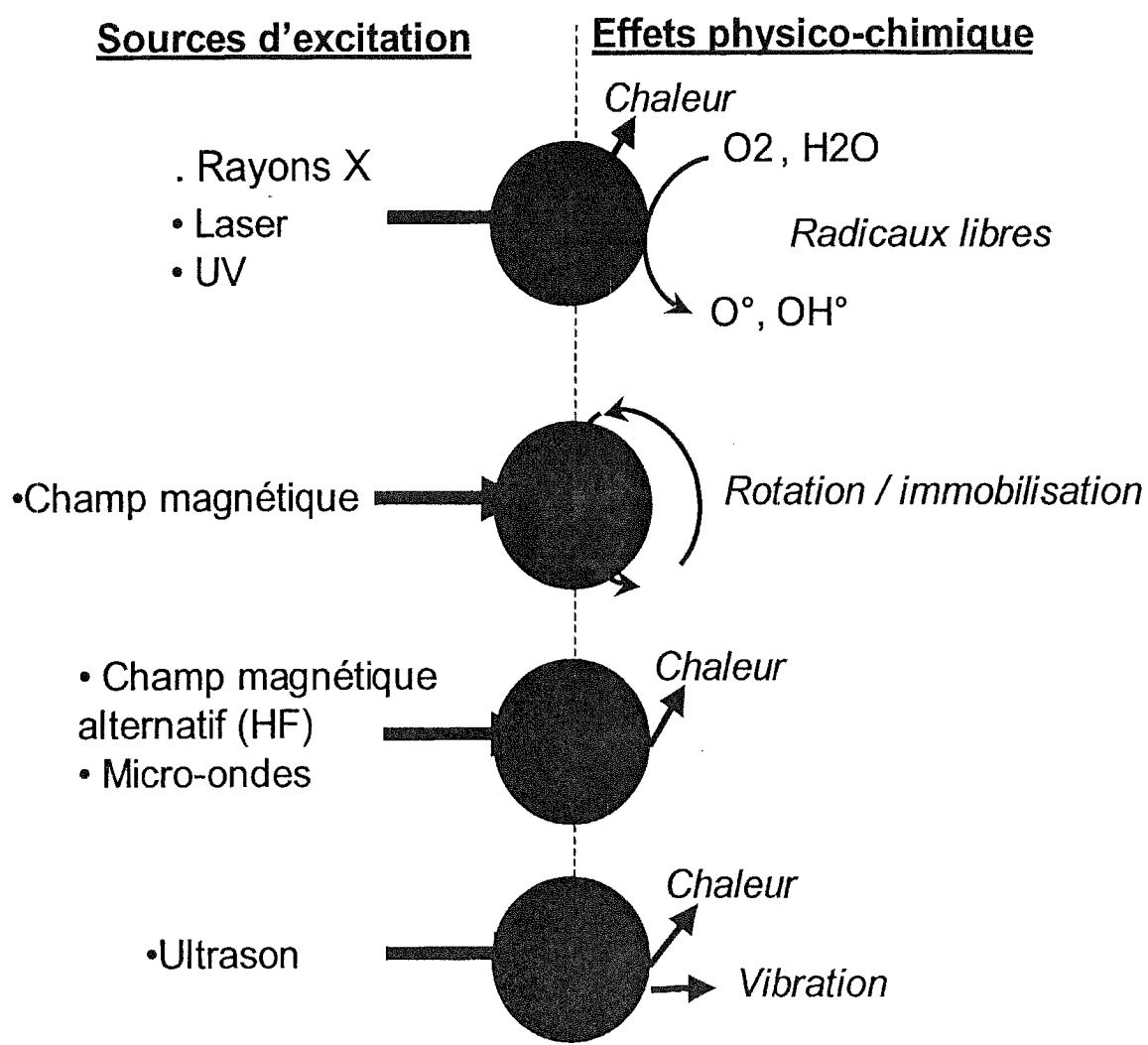


Figure 2

3/4

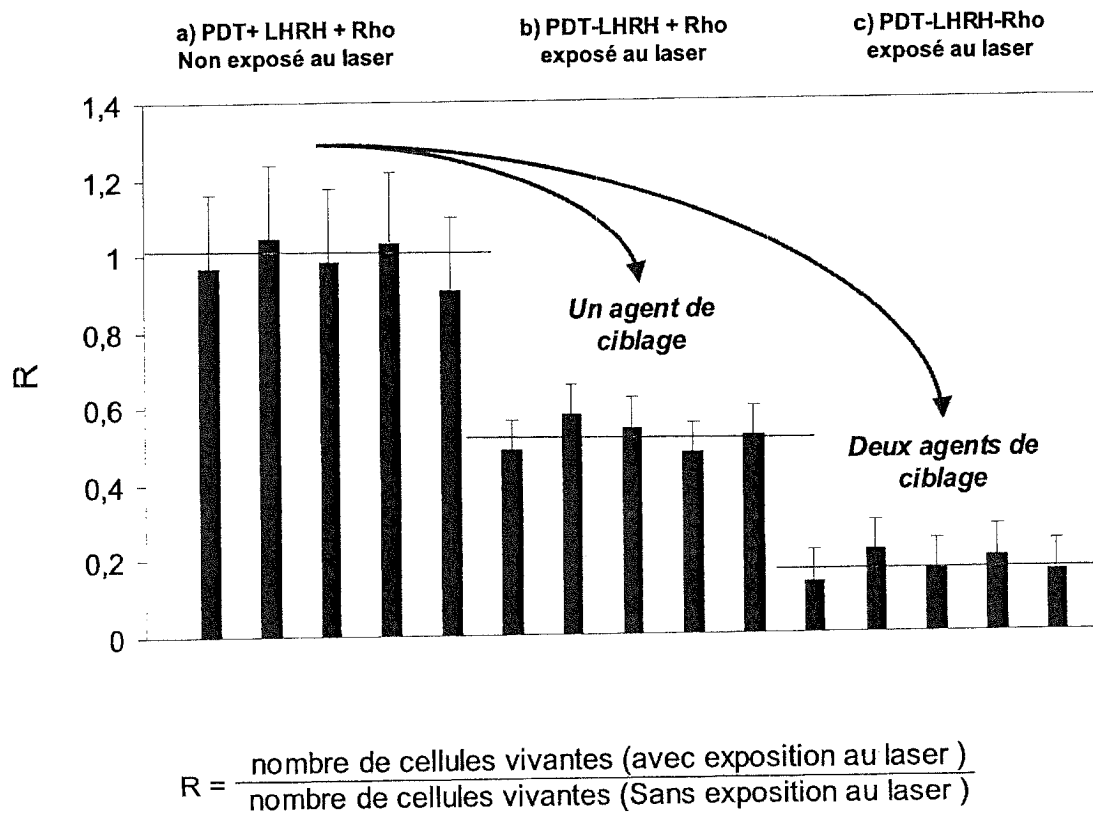
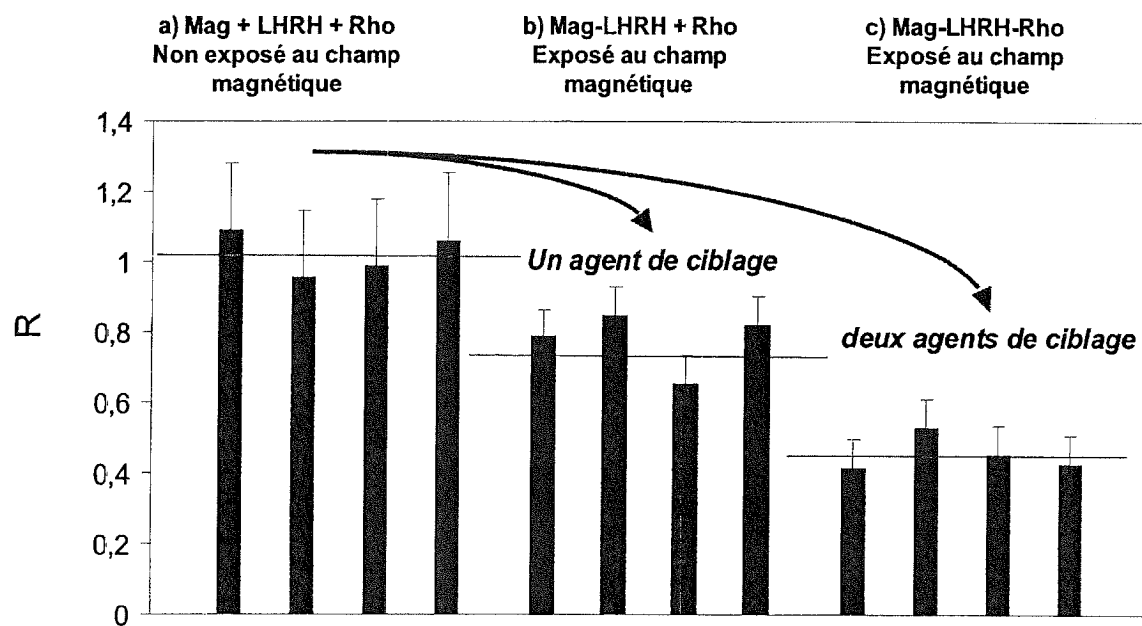


Figure 3

4/4



$$R = \frac{\text{nombre de cellules vivantes (avec exposition au champ magnétique)}}{\text{nombre de cellules vivantes (Sans exposition au champ magnétique)}}$$

Figure 4



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE PARTIEL

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement
national

FA 660404
FR 0411806

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,X	US 6 514 481 B1 (PRASAD PARAS N ET AL) 4 février 2003 (2003-02-04) Phrase 0035; Phrase 0038* revendications; exemples 1,3 *	1-22	A61K9/51 A61K9/16 A61K49/00 A61K49/18 A61P35/00
D,X	LEVY, LAURENT ET AL: "Nanochemistry: Synthesis and Characterization of Multifunctional Nanoclinics for Biological Applications" CHEMISTRY OF MATERIALS , 14(9), 3715-3721 CODEN: CMATEX; ISSN: 0897-4756, 2002, XP002334875	1-22	
Y	* figures 1,2 *	1-22	
X	WO 01/58458 A (RICE UNIVERSITY) 16 août 2001 (2001-08-16) * page 42, ligne 10 - page 43, ligne 20; revendications 1-12 *	1-22	
D,Y	LIU, XIANQIAO ET AL: "Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres" JOURNAL OF MAGNETISM AND MAGNETIC MATERIALS , 270(1-2), 1-6 CODEN: JMMMD; ISSN: 0304-8853, 2004, XP002334876 * abrégé * * page 6, colonne 1 *	1-22	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) A61K
		-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 juillet 2005		Berte, M	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	 & : membre de la même famille, document correspondant	



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

N° d'enregistrement
national

FA 660404
FR 0411806

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	<p>SHIBATA H ET AL: "HYDROXYL RADICAL GENERATION DEPENDING ON O₂ OR H₂O BY A PHOTOCATALYZED REACTION IN AN AQUEOUS SUSPENSION OF TITANIUM DIOXIDE" BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY BIOCHEMISTRY, JAPAN SOC. FOR BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY AND AGROCHEM, TOKYO, JP, vol. 62, no. 12, décembre 1998 (1998-12), pages 2306-2311, XP009042440 ISSN: 0916-8451 * page 2306, colonne 1, alinéa 2 *</p> <p>-----</p>	1-22	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)</p>
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 juillet 2005		Berte, M	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0411806 FA 660404**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 08-07-2005

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6514481	B1	04-02-2003	AU 4305101 A	04-06-2001
			WO 0137721 A2	31-05-2001

WO 0158458	A	16-08-2001	AU 3679801 A	20-08-2001
			AU 2001236798 B2	04-11-2004
			CA 2399293 A1	16-08-2001
			EP 1263447 A1	11-12-2002
			JP 2003522149 T	22-07-2003
			WO 0158458 A1	16-08-2001
			US 2002103517 A1	01-08-2002

**RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 660404
FR 0411806

Certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:

Revendications n'ayant pas fait l'objet de recherches:

-

Raison pour la limitation de la recherche:

Les revendications 1-22 présentes ont trait à une très grande variété de nanoparticules. En fait, les revendications contiennent tant d'options que le manque de clarté (et/ou de concision) au sens de l'Article L.612-6 CPI qui s'en suit, est d'une importance telle qu'une recherche significative de l'objet des revendications devient impossible. Par conséquent, la recherche a été effectuée pour les parties de la demande qui apparaissent être claires (et/ou concises), c'est à dire des nanoparticules ont été recherchées décrites dans les exemples et leurs homologues proches .

